



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 46 446.4

Anmeldetag: 04. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber: BRUKER OPTIK GmbH,
Ettlingen/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Aufbringen eines Probenfilms
auf einen Probenträger

IPC: G 01 N 1/28

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 02. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Ebert

WITTE, WELLER & PARTNER

Patentanwälte

Rotebühlstraße 121 · D-70178 Stuttgart

Anmelder:

BRUKER OPTIK GMBH
Rudolf-Plank-Straße 23
D-76275 Ettlingen
Deutschland

4. Oktober 2002

1203P152 VH-ad

Verfahren zum Aufbringen eines Probenfilms auf einen Probenträger

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Aufbringen eines Probenfilms auf einen Probenträger für eine nachfolgende spektroskopische Analyse, bei dem eine Probenmenge in flüssigem Zustand auf eine Probenposition auf den Probenträger aufgebracht und anschließend zu dem Probenfilm getrocknet wird.

Ein solches Verfahren ist allgemein durch seine Anwendung bekannt.

Im Rahmen der spektroskopischen Probenanalyse, insbesondere im Rahmen der Schwingungsspektroskopie, wie beispielsweise der IR-, NIR-, Raman-Spektroskopie, dient das eingangs genannte Verfahren zur Probenvorbereitung für die nachfolgende spektroskopische Analyse.

Die auf den Probenträger aufzubringenden Proben können beispielsweise biologische Flüssigkeiten wie Serum, Urin, suspendierte Zellen, Zellkulturmedien usw. oder in Wasser gelöste Analyten sein, die nachfolgend IR-spektroskopisch analysiert und insbesondere quantifiziert werden sollen.

Aufgrund der hohen Eigenabsorption von einigen Lösungsmitteln im infraroten (IR) Spektralbereich wird die auf den Probenträger in flüssigem Zustand aufgebrachte Probenmenge vor der spektroskopischen Messung zu einem Probenfilm getrocknet. Im Idealfall bilden sich dabei homogene Probenfilme, d.h. Probenfilme, die eine einheitliche Schichtdicke aufweisen, so daß das Gesetz von Lambert-Beer gültig ist. Dieses Verfahren des Aufbringens eines Probenfilms durch Trocknen einer flüssig aufgebrachten Probenmenge ist jedoch für viele Lösungsmittel, insbesondere Wasser, ungeeignet, weil der durch Trocknung entstehende Probenfilm keine über die Fläche der Probenposition einheitliche Schichtdicke besitzt, sondern zum Rand hin eine größere Schichtdicke besitzt als im Zentrum. Dieses Phänomen wird nachfolgend mit Bezug auf Fig. 3 und 4 erläutert.

In Fig. 3 ist ein Probenträger 1 dargestellt, der eine Probenposition A aufweist, auf die eine Probenmenge 2 im flüssigen Zustand aufgebracht wurde. Die Probenmenge weist typischerweise ein Volumen von 1 - 100 μ l auf, während die Probenposition A einen Durchmesser von etwa 1 - 20 mm aufweist. Die Probenposition A ist derjenige Bereich des Probenträgers, der bei der nachfolgenden spektroskopischen Analyse im Falle beispielsweise der IR-Spektroskopie von dem Lichtstrahl ausgeleuchtet wird.

Wird nun die Probenmenge, wie in Fig. 3 dargestellt, in einem Tropfen auf die Probenposition A des Probenträgers 1 gleichmäßig verteilt aufgebracht, bildet die flüssige Probenmenge auf dem Probenträger 1 unabhängig davon, ob das Aufbringen manuell mit der Pipette oder mit Hilfe eines Pipettierautomaten durchgeführt wird, auf der Probenposition im Schnitt in etwa die Form eines Halbovals. Die Oberflächenspannung der flüssigen Probenmenge bestimmt dabei die genaue Form des Halbovals.

Nach der Trocknung der Probenmenge 2 bleibt ein Probenfilm 3 zurück, der an den Rändern deutlich dicker ist als im Zentrum, wie in Fig. 4 dargestellt ist. Der Probenfilm 3 weist demnach ein kraterähnliches Aussehen auf. Dieser Kraterbildungseffekt ist besonders ausgeprägt, wenn als Lösungsmittel für die Probe Wasser verwendet wird. Die Schichtdicke des entstandenen Probenfilms 3 ist somit über die Probenposition A gesehen nicht homogen.

Es hat sich herausgestellt, daß bei Mehrfachaustragung derselben Probe und derselben Probenmenge auf mehrere Probenpositionen die nach Trocknung entstandenen Probenfilme zudem oft unterschiedliche Gestalt aufweisen. Das bekannte Verfahren zum

Aufbringen eines Probenfilms auf einen Probenträger hat somit nicht nur eine Inhomogenität der Schichtdicke eines jeden Probenfilms für sich zur Folge, sondern auch, daß bei einer spektroskopischen Analyse aus mehreren Probenfilmen, die von derselben Probe hergestellt wurden, sehr unterschiedliche Spektren erhalten werden, die sich insbesondere in der Signalintensität deutlich unterscheiden können. Das bekannte Verfahren hat daher den Nachteil, daß die Probenfilme nicht eindeutig reproduzierbar hergestellt werden können.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der eingangs genannten Art dahingehend weiterzubilden, daß die vorstehend genannten Nachteile vermieden werden, und daß insbesondere Probenfilme derselben Probe so reproduzierbar hergestellt werden können, daß die nachfolgende spektroskopische Analyse verlässliche Ergebnisse liefert.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe hinsichtlich des eingangs genannten Verfahrens dadurch gelöst, daß die flüssige Probenmenge in einer Vielzahl von Teilmengen auf die Probenposition aufgebracht wird, derart, daß sich die einzelnen Teilmengen auf der Probenposition vor der Trocknung gegenseitig nicht berühren.

Anstatt nun wie bei der herkömmlichen Vorgehensweise eine Probenmenge in einem Schritt gleichmäßig auf die das spätere Meßareal der spektroskopischen Analyse bildende Probenposition zu verteilen, ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorgesehen, eine flüssige Probenmenge in einer Vielzahl von Teilmengen, d.h. in kleinen Portionen, derart auf die Probenposition des Probenträgers aufzubringen, daß sich die einzelnen Teilmengen

der Probenmenge gegenseitig nicht berühren. Auf die Probenposition werden demnach eine Vielzahl kleiner disjunkter Tröpfchen der Probe aufgebracht, die dann zu dem Probenfilm trocknen, ohne sich gegenseitig zu vermischen. Bei jeder dieser Teilmengen tritt zwar nach ihrer Trocknung der zuvor beschriebene Kraterbildungseffekt auf, da jedoch eine Vielzahl solcher Teilmengen auf der Probenposition verteilt sind, mittelt sich dieser Kraterbildungseffekt über die Fläche der Probenposition gesehen aus, so daß der nach Trocknung der Teilmengen auf der Probenposition entstehende Probenfilm über die Gesamtfläche der Probenposition gesehen wesentlich homogener ist, als wenn die Probenmenge als Ganzes in einem Schritt auf die Probenposition aufgetragen wird.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens werden die Teilmengen feinrasterartig mit maximaler Belegungsdichte auf die Probenposition aufgebracht.

Hierbei ist von Vorteil, daß der nach Trocknung der Teilmengen entstehende Probenfilm durch die feinrasterartige Anordnung der Teilmengen auf der Probenposition mit maximaler Belegungsdichte, ohne daß sich die Teilmengen miteinander vermischen, hinsichtlich seiner Schichtdicke optimal homogen ist. Zur Aufbringung der Vielzahl der Teilmengen in rasterartiger Anordnung können handelsübliche Pipettier-Roboter verwendet werden, die die vielen Teilmengen automatisiert auf die Fläche der Probenposition des Probenträgers aufbringen, ohne daß diese sich nach der Auftragung berühren und miteinander verschmelzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung betragen die einzelnen Teilmengen im Bereich von $1/10.000$ bis $1/10$ der auf die Probenposition aufzubringenden Probenmenge.

Je kleiner die Teilmengen sind, desto höher kann die Belegungsdichte der Teilmengen auf der Probenposition sein und desto homogener ist die Schichtdicke des nach Trocknung der Teilmengen entstehenden Probenfilms.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung wird auf die Probenposition zunächst eine erste Lage von Teilmengen aufgebracht, und nach dem Trocknen der ersten Lage wird zumindest eine weitere Lage von Teilmengen aufgebracht und getrocknet.

Diese Maßnahme ist dann von Vorteil, wenn die auf die Probenposition aufzubringende Probenmenge nicht in einer Lage auf die Probenposition des Probenträgers aufgebracht werden kann. Diese Maßnahme hat darüber hinaus den Vorteil, daß insgesamt eine größere Probenmenge auf die Probenposition des Probenträgers aufgebracht werden kann, um die Sensitivität der nachfolgenden spektroskopischen Untersuchung zu erhöhen.

In diesem Zusammenhang ist es bevorzugt, wenn die Teilmengen der zumindest einen weiteren Lage bezüglich der Positionen der Teilmengen der ersten Lage versetzt auf die Probenposition aufgebracht werden.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die Flächenbelegung des Probenfilms auf der Probenposition des Probenträgers noch weiter verbessert werden kann, d.h. daß auf der Probenposition

keine Areale verbleiben, auf denen kein Probenfilm vorhanden ist.

Alternativ zu der vorstehend genannten Ausgestaltung ist es auch bevorzugt, wenn die Teilmengen der zumindest zweiten Lage auf die Position der Teilmengen der ersten Lage aufgebracht werden.

Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, daß es beim Aufbringen der zweiten Lage von Teilmengen der Probenmenge aufgrund der Anlösung der bereits getrockneten ersten Lage nicht zu Verschmierungen bzw. Vermischungen der Teilmengen der ersten Lage kommen kann, da sich ein solches Anlösen und Vermischen unter Umständen als nicht kontrollierbar erweisen kann, wodurch die spektroskopische Analyse beeinträchtigt werden könnte.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung wird der Probenträger vor, während oder nach dem Aufbringen der Teilmengen erwärmt.

Hierbei ist von Vorteil, daß das erfindungsgemäße Verfahren insgesamt mit geringerem Zeitaufwand durchgeführt werden kann, insbesondere dann, wenn die Probenmenge in mehreren Lagen von Teilmengen auf die Probenposition des Probenträgers aufgebracht wird. Durch das Erwärmen des Probenträgers kann die Trocknung der Teilmengen nämlich beschleunigt werden, so daß insbesondere dann, wenn mehrere Probenmengen auf verschiedene Probenpositionen eines Probenträgers aufgebracht werden, bereits mit dem Aufbringen der zweiten Lage von Teilmengen auf der ersten Probenposition wieder fortgefahren werden kann, nachdem gerade ei-

ne Lage von Teilmengen auf die letzte Probenposition des Probenträgers aufgebracht wurde.

In weiteren bevorzugten Ausgestaltungen wird als Probenträger eine Platte aus insbesondere IR-transparentem Material verwendet, oder es wird als Probenträger eine Platte vorzugsweise aus Metall oder mit metallischer Oberfläche verwendet, deren Oberfläche angeraut ist.

Im ersteren Fall eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Probenvorbereitung für eine spektroskopische Analyse von Proben durch Messung in Transmission, d.h. im Durchlicht durch den Probenträger, wobei für den Probenträger Materialien wie Silizium, Zinkselenid, Calciumfluorid, Bariumfluorid, Talliumbromid und Germanium verwendet werden können. In dem zweiten Fall eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Probenvorbereitung für eine spektroskopische Analyse mittels Messung in diffuser Reflexion an der aufgerauten Oberfläche des Probenträgers.

Des weiteren eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere in Verwendung mit Mikrotiterplatten, die eine Vielzahl von Probenpositionen aufweisen, beispielsweise 96, 384 oder 1536 Positionen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Probenfilme derselben Probe sehr homogen und reproduzierbar auf den Probenträger aufgebracht werden, so daß bei Mehrfachaustragungen derselben Probe die in der nachfolgenden spektroskopischen Untersuchung erhaltenen Spektren verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Weitere Vorteile und Merkmale ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung und der beigefügten Zeichnung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in der Zeichnung dargestellt und wird mit Bezug auf diese hiernach näher beschrieben. Es zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Probenträgers mit einer Vielzahl von Probenpositionen in Draufsicht;
- Fig. 2 eine stark vergrößerte Darstellung einer einzelnen Probenposition des Probenträgers in Fig. 1 in Draufsicht, an der das erfindungsgemäße Verfahren veranschaulicht ist;
- Fig. 3 eine schematische Darstellung eines Probenträgers mit einer Probenposition, bei der eine Probenmenge im flüssigen Zustand nach der herkömmlichen Methode aufgebracht wurde; und
- Fig. 4 eine Fig. 3 vergleichbare Darstellung, nachdem aus der flüssigen Probenmenge in Fig. 3 ein Probenfilm durch Trocknung nach dem herkömmlichen Verfahren entstanden ist.

In Fig. 1 ist ein Probenträger 10 dargestellt, der in Form einer Mikrotiterplatte mit insgesamt 96 Probenpositionen 12 ausgebildet ist. Die Probenpositionen 12 sind in acht mit A bis H bezeichneten Reihen und in zwölf mit I bis XII bezeichneten Spalten angeordnet. Eine erste Probenposition "I A" ist mit dem Bezugszeichen 14, und eine letzte Probenposition "XII H" ist mit dem Bezugszeichen 16 versehen.

Auf jeder der Probenpositionen 12 kann ein Probenfilm in hier-nach beschriebener Weise für eine nachfolgende spektroskopische Analyse der Probe aufgebracht werden. Die nachfolgende spektroskopische Analyse besteht dabei beispielsweise in einer Infrarot(IR)-, Nahinfrarot(NIR)- oder Raman-spektroskopischen Analyse.

Das hiernach beschriebene Verfahren zum Aufbringen von Probenfilmen auf die Probenpositionen 12 des Probenträgers 10 eignet sich insbesondere für Proben in wäßrigen Lösungen, wie biologische Flüssigkeiten, beispielsweise Serum, Urin, suspendierte Zellen, Zellkulturmedien usw., oder in Wasser gelöste Analyten, die nachfolgend beispielsweise durch IR-Spektroskopie quantifiziert werden sollen.

Je nachdem, ob die optische spektroskopische Analyse in Transmission oder Reflexion, insbesondere diffuser Reflexion, durchgeführt werden soll, ist der Probenträger 10 zumindest im Bereich der Probenpositionen 12 eine Platte aus insbesondere Infrarot-transparentem Material oder weist eine angerauhte metallische Oberfläche auf.

Um auf den Probenpositionen 12 Probenfilme von nachfolgend spektroskopisch zu analysierenden Proben aufzubringen, wird wie folgt am Beispiel der Probenposition 12 beschrieben vorgegangen.

Die auf die Probenposition 12 aufzubringende Probenmenge wird im flüssigen Zustand auf die Probenposition 12 aufgebracht, wobei diese Probenmenge nicht auf einmal bzw. in einem Schritt, sondern in einer Vielzahl von Teilmengen 18, wie in Fig. 2 dargestellt ist, auf die Probenposition 12 aufgebracht wird, wobei sich die Teilmengen 18 gegenseitig nicht berühren und somit nicht miteinander vermischen können. Diese Teilmengen 18 werden dann auf der Probenposition 12 des Probenträgers 10 zu dem Probenfilm getrocknet.

Die einzelnen Teilmengen 18 stellen kleine Portionen bzw. Tröpfchen der auf die Probenposition 12 aufzubringenden Probenmenge dar, die feinraasterartig angeordnet werden. Zum Aufbringen der einzelnen Teilmengen 18 auf die Probenposition 12 kann ein handelsüblicher Pipettier-Roboter oder Mikro-Dispenser verwendet werden, der die vielen Teilmengen 18 in Form kleiner Tröpfchen mit einem Einzelvolumen von typischerweise 1 bis 500 nl automatisiert auf die gesamte Fläche der Probenposition 12 des Probenträgers 10 aufbringt, ohne daß sich die Teilmengen 18 nach dem Aufbringen auf der Probenposition 12 berühren und miteinander verschmelzen. Die sich aus den Teilmengen 18 ergebende Probengesamtmenge beträgt etwa 1 bis 100 μ l. Die Teilmengen 18 betragen einzeln etwa 1/10 bis 1/10.000 der Probengesamtmenge.

Dabei werden die einzelnen Teilmengen mit einer maximalen Belegungsdichte auf die Probenposition 12 aufgebracht. Es sollte

ein möglichst großer Teil der verfügbaren Fläche der Probenposition 12 von den Teilmengen 18 bedeckt werden, die dann voneinander getrennt trocknen, d.h. ohne sich gegenseitig zu berühren.

Um eine maximale Beschickung der Probenposition 12 mit der anschließend zu analysierenden Probe zu erreichen, werden möglichst kleine Volumina für die Teilmengen 18 verwendet. Je kleiner die Teilmengen 18 bzw. Volumina der Tröpfchen sind, desto homogener wird die Schichtdicke des nach dem Trocknen der Teilmengen 18 hergestellten Probenfilms.

Sollte die auf die Probenposition 12 aufzubringende Probenmenge nicht in einer Lage pipettierbar sein, kann zunächst eine erste Lage von Teilmengen 18 auf die Probenposition 12 aufgebracht und getrocknet werden, und nach dem Trocknen der ersten Lage dieser Teilmengen 18 können dann weitere Lagen von Teilmengen 18 aufgebracht und getrocknet werden. Die eine oder mehreren weiteren Lagen an Teilmengen 18 werden dabei möglichst exakt auf die Positionen der Teilmengen 18 bzw. getrockneten Probenflecken dieser Teilmengen 18 der ersten Lage aufgebracht, um eine nicht kontrollierbare Vermischung von Teilmengen 18 der ersten Lage zu bewirken, die sich durch eine Anlösung dieser Probenflecken durch das Aufbringen der weiteren Lagen einstellen könnte.

Auf diese Weise lassen sich sukzessive beliebig dicke Schichtdicken erzeugen, wodurch die Empfindlichkeit der nachfolgenden spektroskopischen Analyse gesteigert werden kann.

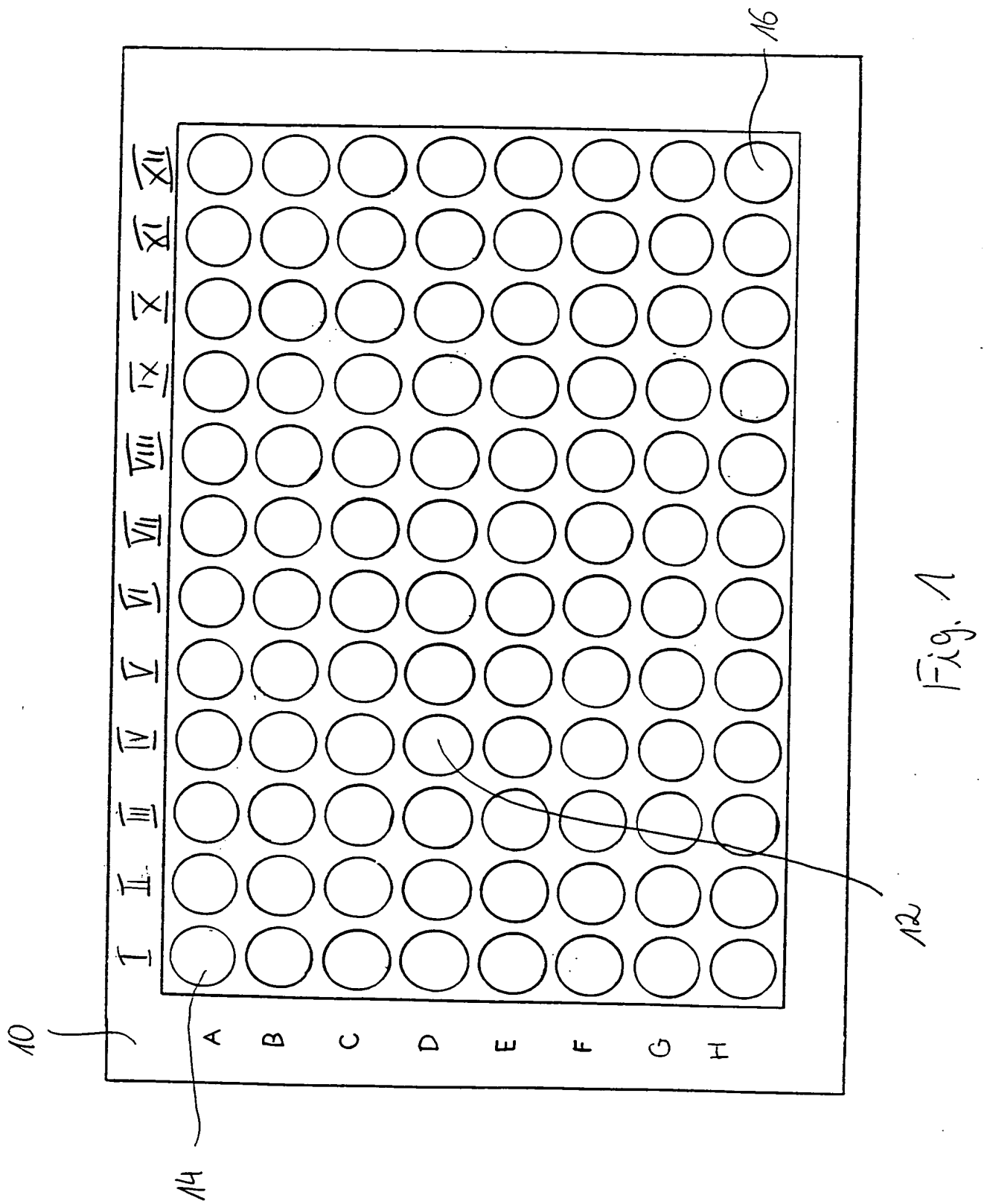
Wieder mit Bezug auf Fig. 1 können auf die vorstehend beschriebene Weise alle 96 Probenpositionen 12 des Probenträgers 10 mit Probenfilmen versehen werden. Dabei werden zunächst beginnend bei der Probenposition 14 oder einer nachfolgenden Probenposition sukzessive alle Probenpositionen 12 bis zur letzten Probenposition 16 mit einer ersten Lage von Teilmengen 18 der jeweiligen Probenmenge der jeweiligen zu untersuchenden Probe aufgebracht. Wenn die letzte Probenposition 16 in dieser Weise erreicht ist, ist die erste Lage an Teilmengen 18 auf der ersten Probenposition 14 bereits getrocknet, so daß bei der Probenposition 14 direkt die zweite Lage an Teilmengen 18 der jeweiligen Probenmenge der jeweiligen Probe aufgebracht werden kann.

Dabei kann die Trocknungszeit für jede Aufbringung optimal angepaßt werden, indem der Probenträger 10 auf eine bestimmte Temperatur erwärmt wird, wodurch die Trocknung beschleunigt wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Aufbringen eines Probenfilms auf einen Probenträger (10) für eine nachfolgende spektroskopische Analyse, bei dem eine Probenmenge im flüssigen Zustand auf eine Probenposition (12) auf dem Probenträger (10) aufgebracht und anschließend zu dem Probenfilm getrocknet wird, dadurch gekennzeichnet, daß die flüssige Probenmenge in einer Vielzahl von Teilmengen (18) auf die Probenposition (12) aufgebracht wird, derart, daß sich die einzelnen Teilmengen (18) auf der Probenposition (12) vor der Trocknung gegenseitig nicht berühren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilmengen (18) feinraasterartig mit maximaler Belegungsdichte auf die Probenposition (12) aufgebracht werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Teilmengen (18) im Bereich von $1/10.000$ bis $1/10$ der auf die Probenposition (12) aufzubringenden Probenmenge betragen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß auf die Probenposition (12) zunächst eine erste Lage von Teilmengen (18) aufgebracht wird und daß nach dem Trocknen der ersten Lage zumindest eine weitere Lage von Teilmengen (18) aufgebracht und getrocknet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilmengen (18) der zumindest einen weiteren Lage bezüglich der Positionen der Teilmengen (18) der ersten Lage versetzt auf die Probenposition (12) aufgebracht werden.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilmengen (18) der zumindest zweiten Lage auf die Positionen der Teilmengen (18) der ersten Lage aufgebracht werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Probenträger (10) vor, während oder nach dem Aufbringen der Teilmengen (18) erwärmt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Probenträger (10) eine Platte aus transparentem, insbesondere Infrarot(IR)-transparentem Material verwendet wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Probenträger (10) eine Platte verwendet wird, deren Oberfläche angeraut ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Probenträger (10) ein solcher mit einer Vielzahl von Probenpositionen verwendet wird, beispielsweise eine Mikrotiterplatte mit 96, 384 oder 1536 Positionen.



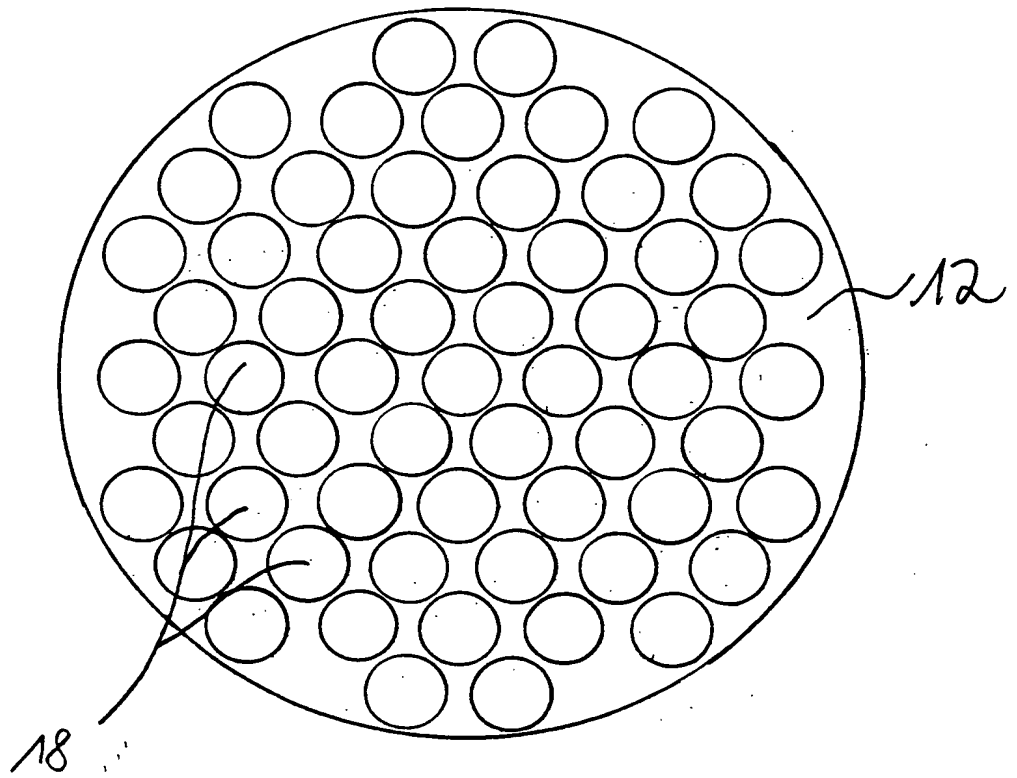


Fig. 2

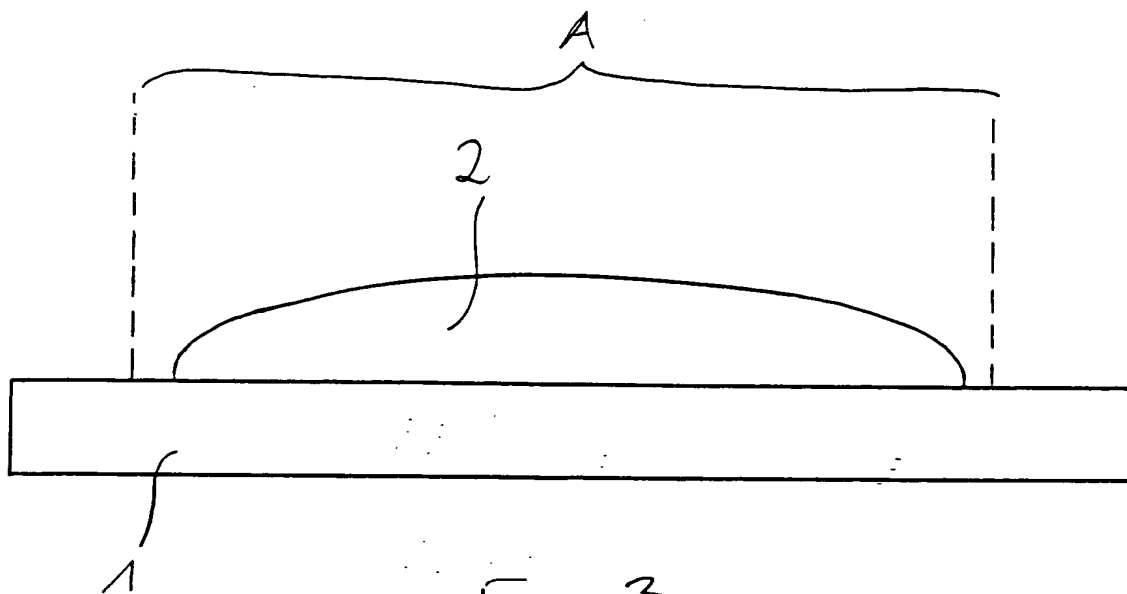


Fig. 3

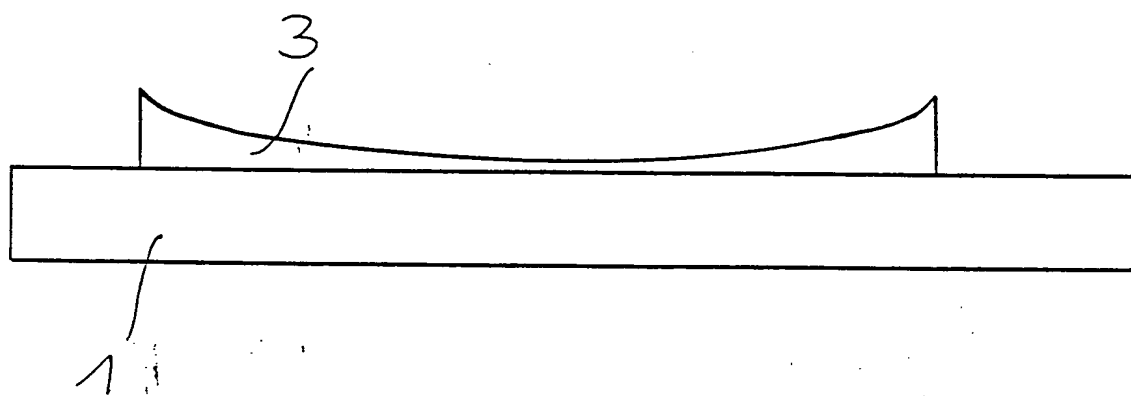


Fig. 4